



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 276 592**

⑫ Número de solicitud: 200501320

⑬ Int. Cl.:
B01D 11/02 (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **01.06.2005**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2007**

Fecha de la concesión: **13.03.2008**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **01.04.2008**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.04.2008

⑲ Titular/es: **Universidad Complutense de Madrid
Rectorado - Avda. de Séneca, 2
28040 Madrid, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

⑳ Inventor/es: **Dietz, Christian;
Cámara Rica, Carmen;
Ramos Rivero, Lourdes y
Ramos Rodríguez, Juan José**

㉑ Agente: **No consta**

㉒ Título: **Dispositivo miniaturizado de extracción con líquidos a presión.**

㉓ Resumen:

Dispositivo miniaturizado de extracción con líquidos a presión.

Se ha desarrollado un dispositivo miniaturizado que permite la extracción con líquidos a altas presiones y temperatura controlada de especies químicas de distinta naturaleza de muestras semi-sólidas o sólidas empaquetadas en una celda cerrada. La invención consiste en un horno termostatzado de dimensiones reducidas en el que se pueden montar hasta tres celdas de extracción de tamaños variables y cuyos extremos se conectan a sendas válvulas equipadas con un serpentín como sistema de enfriamiento. El dispositivo permite el control preciso del volumen de extractante y de la presión aplicados a cada celda, lo que posibilita el empleo de celdas de pequeño tamaño y la extracción de muestras de 20-50 mg con gasto mínimo de disolvente y reactivos.

El sistema de válvulas permite acoplar en línea las distintas celdas de extracción o el dispositivo con sistemas cromatográficos de separación y/o purificación o con ciertos detectores, lo que constituye una herramienta muy útil para la resolución de diversos problemas dentro del campo de la preparación de muestra en Química Analítica.

ES 2 276 592 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Dispositivo miniaturizado de extracción con líquidos a presión.

5 Objeto de la invención

La presente invención se encuadra en el campo técnico de pretratamiento de muestra para el análisis de especies químicas en matrices complejas.

10 Se ha desarrollado un dispositivo miniaturizado que permite la extracción con disolventes a altas presiones y temperaturas de matrices sólidas y semi-sólidas. El empleo de altas temperaturas y presiones permite una mejora significativa de la eficacia del proceso de extracción, lo que redundará en una reducción del consumo de disolvente y del tiempo global de preparación de muestra respecto a los habitualmente involucrados por otras técnicas de extracción convencionales. El sistema puede ser acoplado con facilidad a distintos tipos de sistemas cromatográficos de purificación y/o separación y con ciertos detectores.

Estado de la técnica

20 La extracción con líquidos a presión (PLE) es una técnica de preparación de muestra de reciente introducción (B.E. Richter, J.L. Ezzell, D. Felix, K.A. Roberts, D.W. Later, Am. Lab. 27 (1995) 24). Sin embargo, esta técnica ha experimentado un gran desarrollo en los últimos años por representar una alternativa sencilla, rápida y que implica un menor consumo de disolventes y adsorbentes que las técnicas convencionales empleadas para la extracción de compuestos no volátiles o de volatilidad moderada de muestras semi-sólidas y sólidas. Los diferentes campos de aplicación y las distintas aproximaciones analíticas ensayadas hasta la fecha han sido resumidos y discutidos en distintas revisiones, como J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro, Trends Anal. Chem. 23 (2004); 102-108., L. Ramos, E.M. Kristenson, U.A.Th. Brinkman, J. Chromatography A, 975 (2002) 3-29).

30 Hasta la fecha, se han comercializado tres sistemas de PLE. El primero se comercializa desde 1995 (patentes US 5,843,311, US 5,647,976, US 5,660,727, US 5,785,856). Existen dos modelos de este PLE. El primero alcanza temperaturas de hasta 200°C y presiones de hasta 21 MPa en celdas de extracción de 1, 5, 11, 22 ó 33 ml. Permite el análisis consecutivo de hasta 24 muestras cuyos extractos se recogen en 26 viales de 40 ó 60 ml. Recientemente, se ha introducido una variante, con características similares, pero para el análisis de una única muestra (la celda puede ser de 10, 34, 66 ó 100 ml y el vial para el extracto es de 250 ml). El segundo modelo es para muestras de mayor tamaño, alcanza temperaturas similares pero presiones inferiores (hasta 10 MPa) en celdas de 34, 66 ó 100 ml, y permite el procesamiento consecutivo de hasta 12 muestras recogiendo los extractos en viales de 250 ml.

40 Como alternativa a estos sistemas de PLE, se comercializan otros dos equipos. El primer modelo permite el análisis de hasta seis muestras en paralelo (celdas de 11, 22 ó 33 ml), a temperaturas de 50 a 150°C y con presiones máximas de 15 MPa, siendo los extractos recogidos en viales de 60 ml. El segundo es una variante de este sistema para el análisis de una sola muestra que emplea celdas del mismo tamaño pero los viales pueden ser de 40 ó 60 ml.

50 Finalmente, es importante destacar que, debido a la sencillez del principio de la técnica, algunos autores han desarrollado sistemas de PLE caseros a partir de equipos de SFE (A. Rübel, R. Bierl, Fresenius J. Anal. Chem. 364 (1999) 648.), [W.H. Ding, J.C.H. Fann, J. Chromatogr. A 866 (2000) 79., Windal, D.J. Miller, E. de Pauw, S.B. Hawthorne, Anal. Chem. 72 (2000) 3916.) o han desarrollado sus propios sistemas de PLE (H. Vatus, J. Polzer, L. Stieglitz, J. Chromatogr. A 815 (1998) 231, L. Ramos, J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman, J. Chromatography A, 891 (2000) 275-286.). Hasta la fecha sólo se ha descrito en la bibliografía un ejemplo previo de sistema miniaturizado de PLE (L. Ramos, J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman, J. Chromatography A, 891 (2000) 275-286) que fue desarrollado por uno de los autores de esta patente. Este primer sistema miniaturizado de PLE ha sido empleado con éxito para la extracción de trazas de microcontaminantes ambientales, como hidrocarburos aromáticos policíclicos (L. Ramos, J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman, J. Chromatography A, 891 (2000) 275-286) y cloroanilinas (E.M. Kristenson, S. Angioi, R.J.J. Vreuls, M.C. Gennaro, U.A.Th. Brinkman, J. Chromatogr. A, 2004), de suelos y sedimentos. A pesar del reducido tamaño de muestra empleado en estos estudios (inferior a 50 mg), el sistema permite la extracción reproducible de los analitos endógenos de interés con volúmenes mínimos de disolventes orgánicos (unos 100 µl) y con un ahorro significativo de tiempo respecto a los procedimientos convencionales de tratamiento de muestra (unos 20 min vs varias horas). Su uso combinado con un sistema de análisis instrumental sensible y selectivo permite la determinación inequívoca de los compuestos estudiados sin tratamiento adicional de los extractos, lo que, combinado con el reducido volumen de disolvente empleado, hace factible el acoplamiento directo entre el sistema de PLE y el de separación-detección elegido. Sin embargo, por su diseño, el tamaño de la celda a emplear queda limitado a 10 mm × 9 mm de diámetro exterior (o.d.), siendo el diámetro interno el único parámetro que puede ser modificado (en el intervalo 2-4 mm). El calentamiento se lleva a cabo con una resistencia enrollada en torno a un anillo metálico en cuyo interior se sitúa a celda y el aislamiento con un anillo cerámico que rodea a la resistencia.

65 El número de sistemas de PLE disponibles en el mercado es limitado y ninguno de ellos resulta adecuado para el tratamiento de muestras de pequeño tamaño. Por sus características y falta de flexibilidad de sus diseños, ninguno permite tampoco su acoplamiento en línea ni con otra de las celdas para el tratamiento consecutivo de la muestra ni con un sistema cromatográfico de purificación y/o separación-detección. Tampoco permiten trabajar con celdas de

distinto tamaño de forma simultánea o secuencial, como permite el nuevo dispositivo a que se refiere esta memoria descriptiva.

Descripción de la invención

El equipo PLE diseñado consiste en una serie de celdas de extracción insertadas en un horno equipado con un sistema de control y regulación de temperatura, una bomba de cromatografía líquida (LC) para bombear y presurizar el disolvente en la celda y las respectivas válvulas de inyección (de seis vías), conectadas a la entrada y la salida de la celda de extracción. Mientras que la temperatura elevada acelera la cinética del proceso de extracción, la alta presión mantiene el disolvente en estado líquido a las altas temperaturas empleadas y favorece su penetración en la matriz, lo que resulta en un método de extracción eficaz, rápido y con menor consumo de disolventes, que permite obtener extractos más concentrados y ocasionalmente listos para ser analizados. Al tratarse de un sistema cerrado, existe un menor riesgo de contaminación y/o pérdida de los analitos, se reduce la exposición del analista a disolventes orgánicos y, por el menor consumo de disolventes, resulta más respetuoso con el medio ambiente que otros sistemas de tratamientos convencionales. Todos los parámetros instrumentales se controlan a través de un panel frontal, salvo la presión que se controla con la bomba de LC. El sistema puede ser empleado de forma independiente o acoplado en línea con un sistema cromatográfico de purificación y/o separación-detección.

El sistema de PLE miniaturizado consta de una plancha de aluminio en la que se han insertado tres resistencias eléctricas de tipo cartucho de 140 W para su calentamiento y un termopar tipo "J" para la monitorización y regulación constante de la temperatura a través de un regulador electrónico digital que trabaja con un algoritmo PID (Osaka OK48/482). Esta placa se emplea para calentar las celdas de extracción sujetadas sobre su superficie a temperaturas de entre 25 y 200°C. El conjunto se encuentra en un horno aislado del resto de los componentes del sistema e incluido en una caja metálica de 53 × 35 × 18 cm en cuyo frontal se insertan el controlador y las válvulas (Figura 1), dando lugar a un equipo compacto. Para el bombeo y presurización del sistema se requiere no obstante una bomba de LC externa. El empleo de gases para el desplazamiento de los disolventes es prescindible, y la inserción de un serpentín de pequeño diámetro interior (i.d.) a la salida de la válvula de salida de la celda permite un enfriamiento rápido del extracto sin provocar, en el caso de las muestras de pequeño tamaño, la distorsión de la banda transferida, es decir, sin dilución adicional de los extractos. La presión máxima de trabajo es de 20 MPa y puede ser controlada de manera independiente para cada ciclo de extracción en cada una de las celdas.

El equipo permite la instalación de hasta tres celdas en el horno de manera simultánea, para su extracción independiente, y cada una de ellas puede tener dimensiones diferentes. Las celdas consisten en tubos de acero inoxidable de tamaño variable (en principio, 10-150 mm de longitud; 2-11 mm de i.d.; y 4.6-15 mm de o.d.), si bien es aconsejable que su i.d. aumente de manera proporcional al hacerlo la longitud de la celda. En los extremos de las celdas se dispone algún material (filtros de papel, lana de vidrio o, preferiblemente, fritados metálicos de 0.5 μ m) para evitar que las partículas de la matriz y/o adsorbentes salgan de ella, lo que provocaría la obstrucción de los tubos y válvulas del sistema. Los filtros (o fritados) se fijan manualmente empleando tornillos de acero inoxidable que, a su vez, permiten la conexión de nueces tipo Rheodyne y tubos de acero de LC empleados para conectar los extremos de la celda con sendas válvulas Rheodyne de seis vías. Estas válvulas permiten la presurización del extractante bombeado con una bomba de LC dentro de la celda. Una vez concluida la extracción, el extracto puede ser (i) recogido en un vial de tamaño adecuado, (ii) transferido directamente, gracias al sistema de válvulas, a un sistema cromatográfico adecuado para su purificación y/o separación-detección en línea, o (iii) transferido a la siguiente celda de extracción donde se somete a un tratamiento adicional.

Un diseño detallado del dispositivo del PLE en sus diferentes etapas de funcionamiento se muestra en la Figura 1.

Descripción de las figuras

La presente invención se ilustra con la siguiente figura 1 donde se representa un esquema del Extractor con líquidos a presión. Se muestra una celda conectada a dos válvulas en la etapa de presurización y las diferentes posibilidades de actuación de las válvulas.

El sistema consta de los siguientes elementos:

1. Conexiones de la válvula inferior en posición "load" (α) y "inject" (β);
2. Conexiones de la válvula superior en posición "load" (α) y "inject" (β);
3. Bomba de cromatografía líquida (LC)
4. Celda de extracción de acero inoxidable
5. Detalles de la celda de extracción; a. fritada, b. férula, c. mezcla muestra y dispersante, d. Tapón de lana de vidrio, e. tuerca de cierre con conexión para tubos LC.
6. Serpentín de enfriamiento

7. Recogida de extracto
8. Placa calefactora con cartuchos de resistencia 140 W.
9. Termopar tipo "J"
10. Controlador de temperatura
11. Interior del horno

Modo de realización de la invención

A modo de ilustración de las características antes mencionadas, y sin que este ejemplo sea limitativo respecto a las posibilidades de aplicación del sistema de extracción miniaturizado con líquidos a presión a que se refiere la presente memoria descriptiva, se describe su aplicación para la extracción y purificación rápida, precisa y en un sólo paso, de 22 congéneres endógenos individuales de bifenilos policlorados (PCBs), incluyendo los isómeros tóxicos no- y mono-orto-sustituídos menos abundantes y los indicadores, presentes en alimentos grasos como carne de cerdo, de pollo y pescado (contenido graso, 49%, 22% y 25%, respectivamente).

Una vez optimizadas todas las variables antes mencionadas y que pueden afectar a la eficacia del proceso de extracción y, en esta aplicación en particular, a la eficacia del proceso de purificación de los extractos por efectuarse ésta de manera simultánea dentro de la misma celda de extracción, el método desarrolla los siguientes pasos:

- Una porción representativa del alimento liofilizado, es decir, unos 500 mg, se pesan y se mezclan y homogeneizan en un mortero con cantidades similares de sulfato sódico anhidro y sílice modificada con ácido sulfúrico.
- Después, 300 mg de esta mezcla, o lo que corresponde a 100 mg de muestra, se empaquetan en una celda de extracción de 10 mm \times 4.6 mm. i.d. \times 6.6 mm o.d. en cuya parte inferior se ha instalado previamente de forma manual un fritado metálico que quedaba ajustado por una tuerca de tamaño adecuado. Sobre la muestra se empaquetan también en la celda 900 mg de sílice modificada con ácido sulfúrico y, sobre ésta, 60 mg de sílica neutra hasta completar aproximadamente el 98% del volumen interno de la celda. Se ajusta de forma manual el fritado a la parte superior de la celda y ésta se cierra con la tuerca correspondiente.
- Una vez ajustados los tubos de LC a los extremos de la celda, ésta se instala manualmente en el horno y los extremos libres de los tubos de LC se ajustan en los puertos correspondientes de sendas válvulas de seis vías también de forma manual.
- A continuación, se inicia el programa de temperatura en el dispositivo de PLE diseñado hasta la temperatura finalmente elegida para llevar a cabo la extracción, es decir, de temperatura ambiente a 40°C y, a la vez, se comienza a bombear el disolvente elegido como extractante, *n*-hexano, a 0.4 ml/min con la bomba de LC hasta que éste comienza a eluir por el extremo del capilar situado en la válvula (2). En ese momento, se conmuta la válvula (2) a la posición β y se inicia la presurización del sistema hasta los 12 MPa finalmente fijados como presión óptima de trabajo en este método. Cuando se alcanza esta presión, se conmuta la válvula (1) a la posición β y se inicia la etapa de extracción propiamente dicha.
- El método consiste en dos ciclos de extracción-purificación estática consecutivos de 7 min cada uno. Al final del primer ciclo, se conmuta la válvula (2) a la posición α para despresurizar el sistema de PLE, recogiendo el extracto con los analitos, ya a temperatura ambiente, en un vial graduado de 10 ml a través del serpentín instalado en la válvula (2). Una vez despresurizado el sistema, lo que sucede instantáneamente, se conmuta la válvula (1) a la posición α y se bombeaban 1.5 ml de *n*-hexano para desplazar el disolvente empleado en el primer ciclo de extracción de la celda y de los tubos de LC. Cuando se recogen 1.5 ml de extracto en el vial, se repite el proceso descrito en el punto anterior, salvo en lo referente a la programación de la temperatura, que se mantiene constante a lo largo de todo el experimento. Concluido el segundo ciclo de 7 min, se procede de manera similar a lo descrito para el primer ciclo. El volumen final de extractante recogido es de 3.5 ml y el proceso de PLE se completa en 20 min.
- Terminada la extracción, manualmente, se conmutan de nuevo las válvulas (2) y (1) a sus posiciones β , se desconectan los tubos de LC de las válvulas, se desmonta la celda del horno, se desconectan los tornillos de los extremos y se vacía la celda para su limpieza y uso posterior.
- El extractante recogido en el vial se concentra y se trasvasa a un vial de 1 ml, donde se ajusta su volumen final a 10 μ l, se añade el patrón interno, y se analiza sin tratamiento adicional mediante GC- μ ECD (o GC-ITD(MS/MS) en el caso de los PCBs no-orto-sustituídos menos abundantes, i.e. a niveles de pg/g de grasa).

El presente método permite la determinación precisa y rápida de los analitos investigados en muestras complejas de alimentos grasos con un consumo mínimo de muestra, disolventes y tiempo, posibilitando una preparación de muestra completa, es decir, efectuar la extracción y purificación en un único paso dentro de un sistema cerrado y miniaturizado.

ES 2 276 592 B1

A pesar del pequeño tamaño de muestra empleado, 100 mg, el método permite la extracción eficaz y precisa de los analitos. Las concentraciones promedio de los PCBs determinadas con el sistema de PLE diseñado son 98% y 108% (con valores extremos en el intervalo 83-130%) de las obtenidas al emplear procedimientos convencionales de extracción, como el Soxhlet o la dispersión de la matriz en fase sólida, seguidos de los procesos off-line de purificación habituales para este tipo de estudio. La repetitividad del método fue mejor del 23% en todo los casos y se considera un valor válido para este tipo de análisis (niveles en el intervalo ng-pg/g grasa); la linealidad es superior al 0.94 en el intervalo investigado de 1-10 ng/g muestra, y los límites de detección se sitúan entre 0.009-0.04 ng/g muestra para la mayor parte de los compuestos estudiados aunque sólo se inyecta 1 μ l del extracto final en el sistema de GC- μ ECD.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Dispositivo miniaturizado de PLE para extracción con líquidos en celda cerrada y a temperaturas y presiones elevadas de muestras semi-sólidas y sólidas **caracterizado** porque consta de una serie de celdas de extracción de tamaño variable, un horno equipado con sistema de control y regulación de temperatura, una bomba de cromatografía líquida para bombear y presurizar el disolvente de la celda y válvulas de inyección de varias vías conectadas a la entrada y salida de las celdas de extracción.
- 10 2. Dispositivo miniaturizado de PLE para extracción con líquidos en celda cerrada y a temperaturas y presiones elevadas de muestras semi-sólidas y sólidas, según reivindicación 1, **caracterizado** porque las válvulas de inyección son de seis vías.
- 15 3. Dispositivo miniaturizado de PLE para extracción con líquidos en celda cerrada y a temperaturas y presiones elevadas de muestras semi-sólidas y sólidas, según reivindicación 1, **caracterizado** porque el intervalo de temperatura de trabajo es de 25 a 200°C.
- 20 4. Dispositivo miniaturizado de PLE para extracción con líquidos en celda cerrada y a temperaturas y presiones elevadas de muestras semi-sólidas y sólidas, según reivindicación 1, **caracterizado** porque el intervalo de presión de trabajo es de 1 a 20 MPa.
- 25 5. Dispositivo miniaturizado de PLE para extracción con líquidos en celda cerrada y a temperaturas y presiones elevadas de muestras semi-sólidas y sólidas, según reivindicación 1, **caracterizado** porque el volumen de las celdas puede variarse entre 0.05 y 30 ml.
- 30 6. Dispositivo miniaturizado de PLE para extracción con líquidos en celda cerrada y a temperaturas y presiones elevadas de muestras semi-sólidas, según reivindicaciones 1 y 5, **caracterizado** porque puede utilizar simultáneamente celdas de distinto tamaño.
- 35 7. Dispositivo miniaturizado de PLE para extracción con líquidos en celda cerrada y a temperaturas y presiones elevadas de muestras semi-sólidas y sólidas, según reivindicaciones 1, 5 y 6, **caracterizado** porque las celdas de extracción hechas a medida permiten el análisis de muestras de pequeño tamaño sin dilución de los extractos.
- 40 8. Dispositivo miniaturizado de PLE para extracción con líquidos en celda cerrada y a temperaturas y presiones elevadas de muestras semi-sólidas, según reivindicaciones 1 y 5, **caracterizado** porque el control de la presión puede ser independiente en cada una de las celdas.
- 45 9. Dispositivo miniaturizado de PLE para extracción con líquidos en celda cerrada y a temperaturas y presiones elevadas de muestras semi-sólidas y sólidas, según reivindicación 1 y 5, **caracterizado** porque permite el acoplamiento en línea de las tres celdas del sistema posibilitando hasta tres extracciones sucesivas.
- 50 10. Dispositivo miniaturizado de PLE para extracción con líquidos en celda cerrada y a temperaturas y presiones elevadas de muestras semi-sólidas y sólidas, según reivindicación 1, **caracterizado** porque permite controlar el flujo de disolvente a través de las celdas de extracción.
- 55 11. Dispositivo miniaturizado de PLE para extracción con líquidos en celda cerrada y a temperaturas y presiones elevadas de muestras semi-sólidas y sólidas según reivindicación 1, **caracterizado** porque permite el control exacto del volumen de extractante empleado.
- 60 12. Dispositivo miniaturizado de PLE para extracción con líquidos en celda cerrada y a temperaturas y presiones elevadas de muestras semi-sólidas y sólidas según reivindicación 1, **caracterizado** porque permite llevar a cabo la preparación de muestra y el análisis instrumental de los extractos en un único proceso analítico en línea.
- 65 13. Dispositivo miniaturizado de PLE para extracción con líquidos en celda cerrada y a temperaturas y presiones elevadas de muestras semi-sólidas y sólidas, según reivindicación 1, **caracterizado** porque permite su acoplamiento en línea con otros sistemas cromatográficos de purificación y/o separación-detección del analito.
14. Dispositivo miniaturizado de PLE para extracción con líquidos en celda cerrada y a temperaturas y presiones elevadas de muestras semi-sólidas y sólidas según reivindicación 1, **caracterizado** porque el sistema de enfriamiento a la salida de la celda es opcional.
15. Dispositivo miniaturizado de PLE para extracción con líquidos en celda cerrada y a temperaturas y presiones elevadas de muestras semi-sólidas y sólidas según reivindicaciones 1 y 15, **caracterizado** porque el enfriamiento del extractante se realiza mediante un serpentín de pequeño diámetro exterior que permite la rápida disipación del calor.

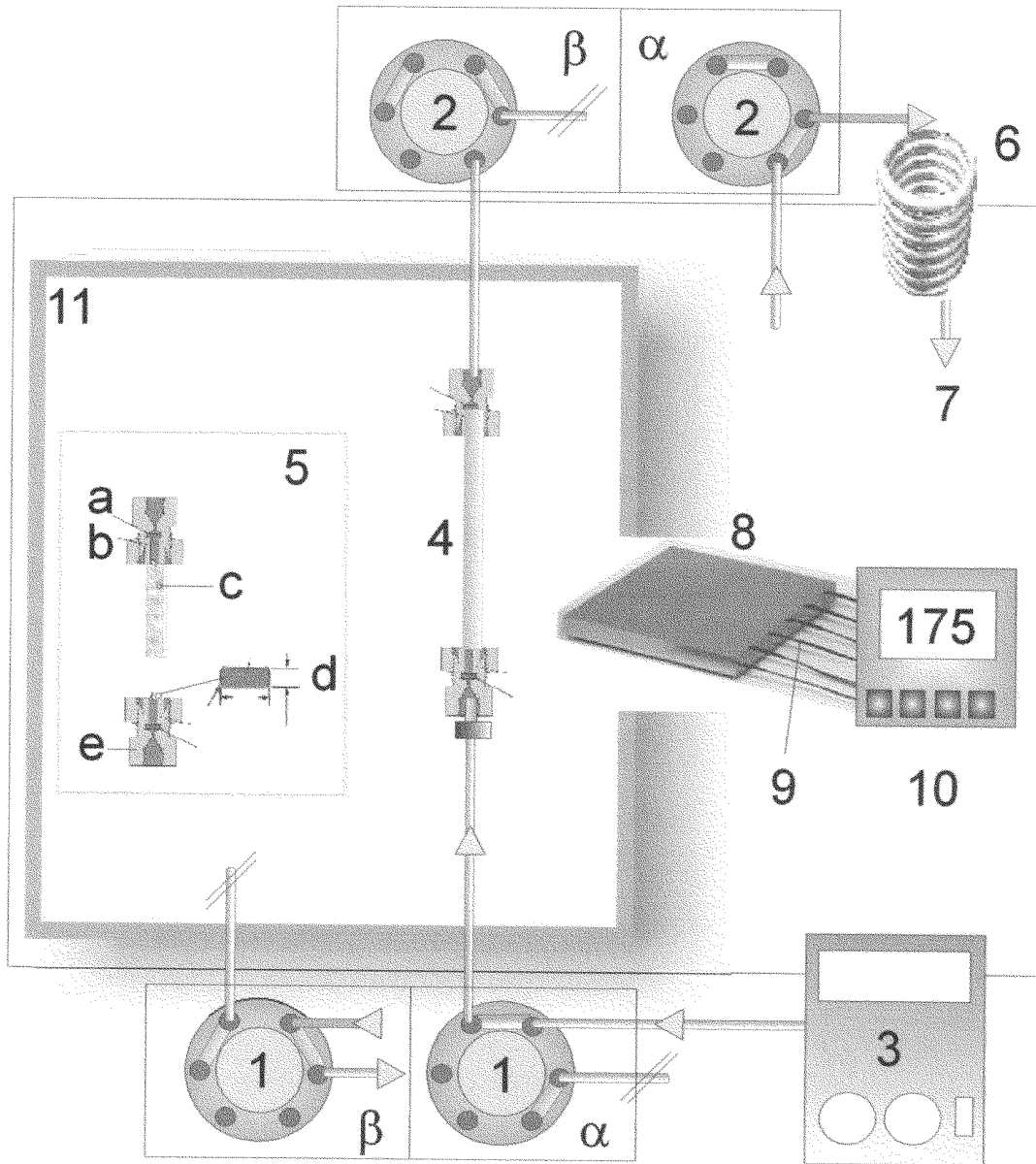


FIGURA 1



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

- ⑪ ES 2 276 592
⑫ Nº de solicitud: 200501320
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 01.06.2005
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: **B01D 11/02** (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2004034021 A1 (FLUID MANAGEMENT SYSTEMS) 22.04.2004, todo el documento.	1-15
A	US 2003096422 A1 (ONG et al.) 22.05.2003, todo el documento.	1-15
A	WO 9534360 A1 (DIONEX CORP) 21.12.1995, todo el documento.	1-15
A	RAMOS et al. "Miniaturised pressurised liquid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil and sediment with subsequent large-volume injection-gas chromatography". Journal of Chromatography A. Vol. 891 (2000), páginas 275-286.	1-15
A	KRISTENSON et al. "Miniaturised pressurised liquid extraction of chloroanilines from soil with subsequent analysis by large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometry". Journal of Chromatography A. Vol. 1058 (2004), páginas 243-249.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
27.04.2007

Examinador
A. Cardenas Villar

Página
1/1